

Mécanisme hormonal de la sécrétion d' α -amylase dans la parotide du lapin in vitro

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Patrick MONNARD

de

Genève

Thèse N° 3374

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1973

Mécanisme hormonal de la sécrétion d' α -amylase dans la parotide du lapin in vitro

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Patrick MONNARD

de

Genève

Thèse N° 3374

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1973

La Faculté de médecine, sur le préavis du professeur Ralph W. Straub, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 7 novembre 1973

Le doyen :
William Geisendorf

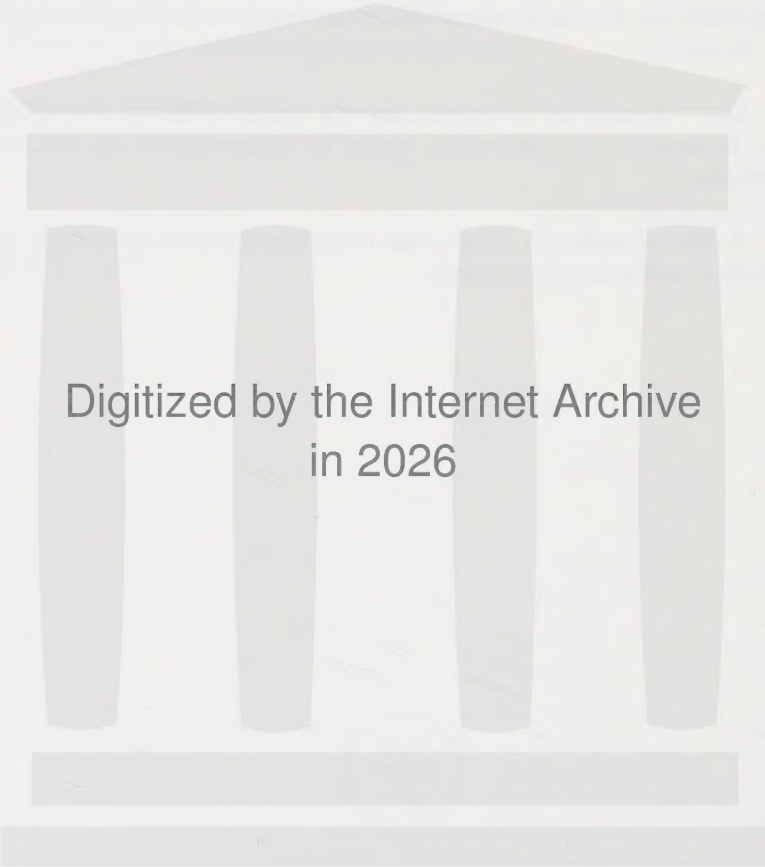
Thèse No 3374



Je tiens à exprimer ma vive reconnaissance au professeur R. W. Straub pour l'honneur de m'avoir accueilli dans son Institut et pour le soutien qu'il m'a témoigné.

Que le docteur M. Schorderet, qui m'a inspiré cette thèse et l'a guidée tout au long de son élaboration, trouve ici l'expression de ma profonde gratitude.

A Mademoiselle Ch. Blank, mes remerciements chaleureux pour son aimable et précieuse collaboration.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545925_0020

I. Introduction.

En étudiant le mécanisme des effets hyperglycémisants de l'adrénaline et du glucagon, E.W. Sutherland et T.W. Rall ont constaté que la majeure partie de la réponse, à savoir la libération du glucose dans le sang à partir du glycogène hépatique, provenait de l'augmentation intracellulaire d'un nucléotide cyclique encore inconnu jusqu'alors, l'adénosine 3'5' monophosphate ¹. Ce nucléotide, plus communément dénommé l'AMP cyclique, est considéré aujourd'hui comme le second messager d'un grand nombre d'hormones, à savoir les catécholamines et les hormones polypeptidiques.

L'adénosine 3'5' monophosphate est formé à partir de l'ATP sous l'influence catalytique de l'adénylate cyclase. La présence d'ions Mg^{++} est nécessaire à la réaction qui libère en plus du pyrophosphate. L'adénosine 3'5' monophosphate subit simultanément une hydrolyse en adénosine 5' monophosphate sous l'effet d'une ou de plusieurs phosphodiesterases ². Les concentrations d'AMP cyclique et d'ATP déterminées dans la plupart des tissus de mammifères sont respectivement de 5×10^{-7} et $5 \times 10^{-3} M$ ³. Dans les homogénats isolés de ces tissus et de ces organes, l'activité de l'adénylate cyclase est généralement détectée dans les fractions cellulaires particulières et plus spécialement dans les fractions particulières de la membrane plasmatique ^{4,5,6}. Les études de distribution enzymatique effectuées au niveau du tissu cérébral localisent l'activité dans les structures synaptiques ^{7,8}. De nombreux travaux, dont ceux de D.A. McAfee, M. Schorderet et P. Greengard au niveau du ganglion cervical supérieur sympathique, ont, du reste, montré le rôle joué par l'AMP cyclique dans la transmission nerveuse ^{9,10,11}.

Différentes approches expérimentales permettent de tester si une hormone agit en stimulant préalablement l'adénylate cyclase membranaire. C'est pourquoi toute recherche dans ce domaine devrait respecter les quatre critères fondamentaux de Sutherland, dans le but d'évaluer réellement si une hormone

donnée produit sur un organe-cible son ou ses effets par ce mécanisme :

(1) l'hormone en question devrait stimuler l'adénylate cyclase de préparations acellulaires isolées à partir des organes-cibles, alors que les hormones dépourvues d'effet ne le devraient pas.

(2) à la dose minimale efficace l'hormone devrait augmenter la teneur intracellulaire d'AMP cyclique dans le tissu entier, alors que les hormones dépourvues d'effet ne le devraient pas. L'augmentation devrait précéder et ne suivre en aucun cas la réponse physiologique. De plus, l'effet devrait être observé à des concentrations physiologiques.

(3) l'effet de l'hormone devrait être potentialisé par la théophylline ou d'autres inhibiteurs de la phosphodiesterase.

(4) l'apport d'AMP cyclique exogène devrait simuler la réponse hormonale.

Il existe donc selon toute évidence une relation étroite entre les récepteurs au niveau desquels agissent les hormones répondant à ces critères et l'adénylate cyclase. Dans tous les tissus où les catécholamines induisent une augmentation intracellulaire d'AMP cyclique, à savoir le foie, la rate, le tissu adipeux, le muscle cardiaque, lisse ou squelettique, les antagonistes des récepteurs β -adrénergiques se sont révélés être des inhibiteurs efficaces. Robison et coll. ont alors émis l'hypothèse que le β -récepteur et l'adénylate cyclase entrent probablement dans le même complexe enzymatique ³. Les structures nerveuses périphériques représenteraient l'une des exceptions ⁹.

En utilisant la théophylline et l'adénosine 3'5' monophosphate (dérivé dibutyrylique) comme inducteurs de la sécrétion d'amylase sur des tranches parotidiennes de rat; Bdolah et Schramm ont montré que le processus sécréteur induit par l'adrénaline dépend du second messager ¹². Il s'agit apparemment d'un effet β car la libération de l'enzyme est

bloquée par le propranolol ; l'effet α , responsable quant à lui de la sécrétion de K^+ , n'entraînerait pas l'activation de l'adénylate cyclase¹³. La parotide est ainsi devenue un excellent modèle pour l'étude de la relation hormone-récepteur. Cette glande exocrine, en particulier la parotide du lapin, offre également un champ d'application plus étendu que les autres préparations :

- elle permet d'une part de mesurer parallèlement les concentrations d'AMP cyclique et la sécrétion d'amylase consécutives à la stimulation hormonale, donc de satisfaire pour le mieux les exigences de Sutherland du point de vue expérimental.

- d'autre part elle est innervée par les fibres du système sympathique et parasympathique. Des recherches histochimiques récentes chez le rat et chez le lapin ont, en effet, montré que l'activité de la cholinestérase et la fluorescence des catécholamines, signalant respectivement la présence de fibres cholinergiques et adrénnergiques, bordent étroitement les cellules acineuses^{14,15}.

Le présent travail a pour but principal l'étude du mécanisme hormonal de la sécrétion d' α -amylase dans la parotide du lapin in vitro. Nous avons voulu montrer principalement la corrélation existant entre l'augmentation intracellulaire du second messenger et la libération d'amylase après stimulation par divers agents sympathiques et parasympathiques. Aussi avons-nous cherché à suivre et à respecter les critères fondamentaux de Sutherland :

- (1) nous avons ainsi déterminé directement les concentrations intracellulaires d'AMP cyclique par une méthode radioactive de déplacement isotopique en l'absence et en présence de divers secrétagogues.

- (2) nous avons suivi les augmentations de la concentration d'AMP cyclique et de la libération d'amylase en fonction du temps et, nous avons comparé ces résultats pour prouver que la réponse hormonale suit bien l'augmentation intracellu-

laire du second messenger.

(3) nous avons potentialisé la réponse hormonale par la théophylline.

(4) nous avons tenté de simuler l'effet physiologique par l'apport d'AMP cyclique exogène.

II. Matériel et méthodes.

Les lapins adultes, nourris de façon normale, sont tués d'un coup de pistolet dans la nuque entre huit et neuf heures du matin. Les deux glandes parotidiennes sont immédiatement prélevées et plongées dans une solution de Krebs-Ringer bicarbonate de pH 7.4, préalablement équilibrée par un mélange gazeux contenant 5 % de CO_2 et 95 % d' O_2 , à 37° , afin d'éviter une libération possible d'amylase dans un système in vitro à froid ¹⁶. Les parotides sont ensuite disséquées sous la loupe, le tissu adipeux et conjonctif étant soigneusement éliminé. Chaque glande est pesée séparément (poids humide), puis découpée en petits cubes d'environ mm^3 , ce qui assure autant que possible la préservation des cellules acineuses. La préparation subit alors une première incubation pendant quinze minutes à 37° dans 30 ml d'une solution de Krebs-Ringer bicarbonate contenant 5 mM de théophylline. Le processus se déroule sous oxygénation constante. Après centrifugation le tissu (la paire de parotides) est suspendu dans une série de douze homogénéisateurs, contenant chacun 1.0 ml de la solution de Krebs-Ringer théophylline. La durée de ce stade expérimental préliminaire n'excède jamais 90 minutes.

La stimulation hormonale débute par l'addition de 0.1 ml d'une solution à 10^{-4} - 10^{-5} M de diverses catécholamines ou d'agents cholinergiques ou, pour les valeurs de contrôle, de la solution physiologique, dans les deux cas en présence de théophylline. La durée de l'incubation, dans les mêmes conditions décrites ci-dessus, est de 5 minutes, à l'exception des études cinétiques pour lesquelles la durée maximale de l'incubation est de 30 minutes. La stimulation se termine par l'addition de 0.1 ml d'acide trichloracétique 50 %. Le tissu est immédiatement homogénéisé, puis centrifugé. Le précipité est solubilisé dans 4.0 ml de NaOH 0.5 N, contenant 5 % de lauryl sulfate de sodium, pour la détermination des protéines ^{17,18}. Le surnageant (1.0 ml) est prélevé, puis neutralisé avec 0.1 ml de TRIS 3.5 M. Les échantillons sont ensuite traités

à 4° par 0.1 ml de ZnSO_4 0.25 M et 0.1 ml de Ba(OH)_2 0.25 M. Ce procédé entraîne la précipitation de la plupart des nucléotides et nucléosides contenus dans l'échantillon, exception faite de l'AMP cyclique, de l'adénosine, de la cytidine et de la cytosine. Poursuivi par une chromatographie sur colonnes échangeuses d'ions (Dowex-50WX-8), il permet une purification satisfaisante de l'adénosine 3'5' monophosphate ¹⁹.

Environ 70 % de l'AMP cyclique synthétisé pendant la stimulation hormonale est recueilli dans les septième, huitième et neuvième ml d'éluat (H_2O). On obtient ainsi une fraction de 3 ml au total dont on prélève et lyophilise un aliquot (en duplication) pour la détermination selon la méthode de Brown de la concentration du nucléotide cyclique ²⁰.

Dans les conditions de sécrétion d'amylase, les lobules subissent la pré-incubation et l'incubation finale dans un milieu dépourvu de théophylline. La stimulation débute par l'addition de 0.2 ml d'une solution à 10^{-4} - 10^{-5} M de l'hormone à tester dans 2.0 ml d'une solution physiologique enrichie par de l'acide β -hydroxybutyrique (5 mM) et du K^+ (15 mM au lieu de 5.6), ce qui permet de maintenir tout au long du processus un taux de sécrétion linéaire ¹⁶. Des prises de même volume (20 μl) ont lieu après 5, 17 et 30 minutes d'incubation ; elles nous donnent la quantité d'amylase libérée dans le milieu par les lobules. Après centrifugation le tissu est homogénéisé dans 1.0 ml d'une solution de Krebs-Ringer et centrifugé à nouveau ; le surnageant contient alors la quantité d'amylase tissulaire résiduelle. Les résultats sont exprimés en % par rapport à l'amylase totale, somme de l'amylase tissulaire résiduelle et de l'amylase libérée après 30 minutes. Le principe de la détermination de l'amylase est basé sur la dégradation de l'amidon en poly- et monosaccharides. Cette dégradation est directement proportionnelle à l'activité de l'échantillon et se détermine par la mesure de la diminution de la coloration bleue donnée par l'iode avec l'amidon (Diagnostica Roche).

III. Résultats.

La figure 1 montre les effets de divers agents adrénergiques et cholinergiques sur la teneur intracellulaire d'AMP cyclique. Toutes les déterminations sont effectuées en présence de théophylline (5×10^{-3} M) afin d'inhiber les phosphodiesterases et d'empêcher la destruction du second messager nouvellement synthétisé dans les lobules parotidiens en réponse à la stimulation hormonale. Les valeurs de repos, en présence et en l'absence de théophylline, sont respectivement de 11.7 ± 0.9 et 4.9 ± 0.26 picomoles / mg de protéine. Les catécholamines (10^{-5} M) produisent une augmentation importante d'AMP cyclique : 139.2 ± 12 en réponse à l'adrénaline, 151.4 ± 13 en réponse à la noradrénaline et 171.7 ± 18 picomoles mg de protéine en réponse à l'isoprotérénol, soit une concentration 11 à 15 fois supérieure à celle des tissus non stimulés. Dans les mêmes conditions, les valeurs obtenues après stimulation par les agents cholinergiques (betanecol, carbachol et pilocarpine, pour des concentrations variant de 10^{-5} à 10^{-4} M), restent en revanche comparables à celles des contrôles ²¹.

Pour connaître les variations des teneurs intracellulaires d'AMP cyclique en fonction des concentrations de l'hormone, nous avons établi une courbe dose-réponse en présence de l'isoprotérénol qui semble être dans notre système l'activateur le plus puissant de l'adénylate cyclase. Nous avons ainsi déterminé que l'augmentation des concentrations intracellulaires du nucléotide cyclique est directement proportionnelle à l'augmentation des concentrations de l'hormone (fig.2). Par ailleurs, nous avons suivi les augmentations de la concentration du nucléotide cyclique en fonction de la durée de l'incubation : cette augmentation est maximale après cinq minutes de stimulation. La figure 3, en effet, nous montre un pic dépassant 100 picomoles d'AMP cyclique / mg de protéine après cinq minutes d'incubation ; dans une estimation parallèle (fig.4) effectuée sans théophylline avec une concentration égale d'isoprotérénol

Figure 1.

Effets des agents sympathicomimétiques et para-sympathicomimétiques sur les concentrations d'AMP cyclique de la parotide du lapin in vitro. Toutes les déterminations sont effectuées en présence de théophylline (5×10^{-3} M), à l'exception d'une série de contrôles.

Figure 1 à 5 : les résultats sont exprimés en picomoles d'AMP cyclique / mg de protéine $\pm$ l'écart-type. La moyenne est établie sur la base minimale de 5 valeurs.

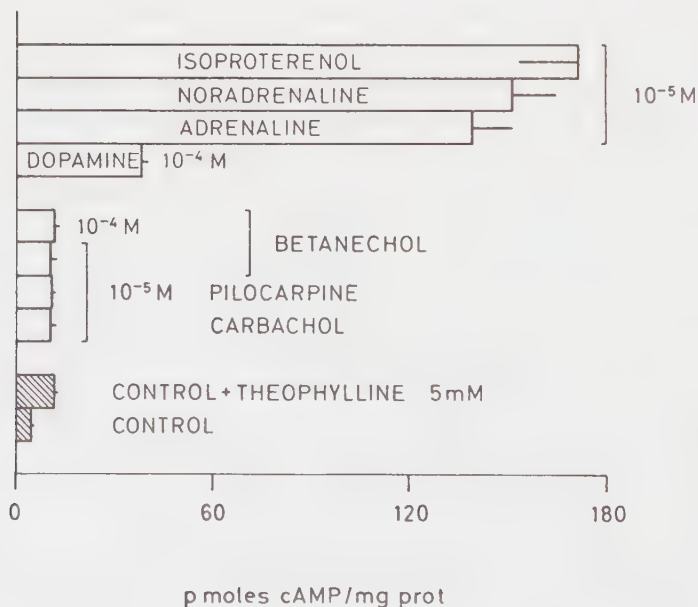


Figure 2.

Courbe dose-réponse établie avec l'isoprotérénol (10^{-9} à 10^{-5} M) en présence de théophylline (5×10^{-3} M) sur les concentrations d'AMP cyclique de la parotide du lapin in vitro.

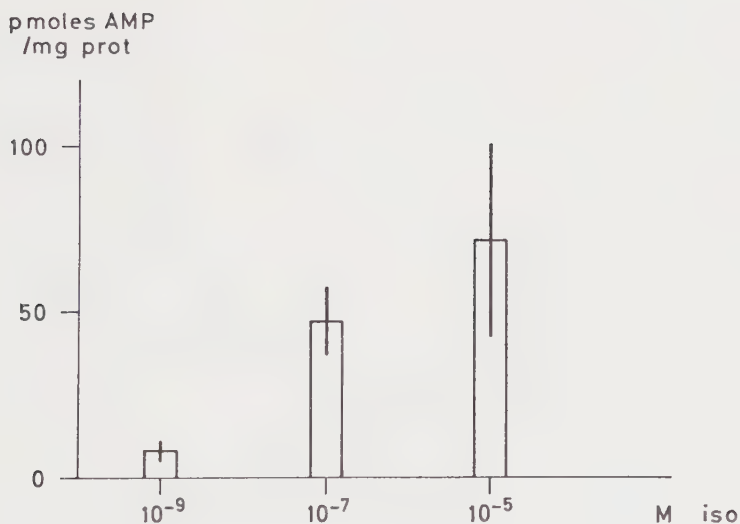


Figure 3.

Effets de l'isoprotérénol (10^{-5} M) en présence de théophylline (5×10^{-3} M) sur les concentrations d'AMP cyclique de la parotide du lapin in vitro, après 1, 5, 15 et 30 minutes de stimulation.

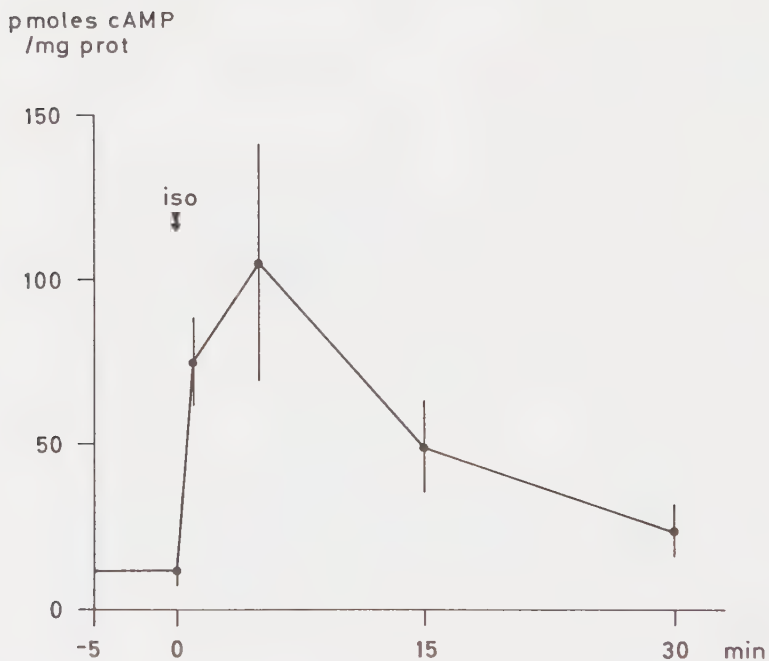
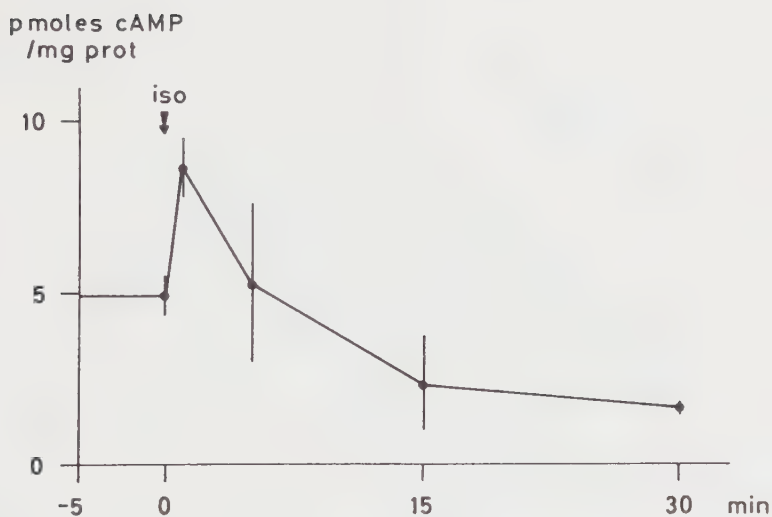


Figure 4.

Effets de l'isoprotérénol (10^{-5} M) en l'absence de théophylline sur les concentrations d'AMP cyclique de la parotide du lapin in vitro après 1, 5, 15 et 30 minutes de stimulation.



(10^{-5} M), la teneur d'AMP cyclique est maximale après une minute et n'atteint pas 10 picomoles / mg de protéines ; cette concentration est néanmoins doublée par rapport à la concentration basale.

Nous avons pu totalement inhiber l'activation de l'adénylate cyclase par le propranolol (2×10^{-4} M), antagoniste spécifique des récepteurs β -adrénergiques, alors que la phentolamine, antagoniste spécifique des récepteurs α -adrénergiques, ne peut à la même concentration inhiber l'augmentation intracellulaire d'AMP cyclique. On obtient un blocage partiel de cette augmentation avec une concentration de propranolol égale à 2×10^{-5} M. Le propranolol et la phentolamine seuls n'apportent aucun changement aux concentrations basales du nucléotide cyclique. La figure 5 illustre ces différents résultats.

L'étape suivante a consisté à établir la corrélation entre les teneurs intracellulaires d'AMP cyclique et l'effet hormonal observé. Nous avons ainsi stimulé notre préparation avec les agents capables d'activer l'adénylate cyclase et déterminé la libération d'amylase par les cellules parotidiennes selon la méthode décrite plus haut. D'autre part nous avons également étudié l'effet des agents cholinergiques sur cette libération, car ceux-ci sont aussi de puissants sécrétagogues in vivo et in vitro ^{22,23}.

Les agents cholinergiques libèrent en moyenne, après 30 minutes de stimulation, 35 à 45 % d'amylase totale ; l'isoprotérénol, la noradrénaline et la phényléphrine libèrent respectivement 60.8 ± 1.53 , 57.32 ± 0.86 et 42.02 ± 2.51 % d'amylase totale. Les figures 6, 7 et 8 comparent ces différents résultats. La somme de l'amylase totale n'augmente pas durant toute la durée de l'incubation ; aucune synthèse n'intervient donc dans le processus sécrétoire, ce qui a été démontré également par d'autres auteurs ²⁴. Tous nos résultats montrent une sécrétion d'amylase maximale après 30 minutes d'incubation, ce qui

Figure 5.

Effets des antagonistes spécifiques des récepteurs α et β -adrénergiques sur les concentrations d'AMP cyclique de la parotide du lapin in vitro, après stimulation par l'isoprotérénol (10^{-5} M) et l'épinephrine (10^{-5} M) en présence de théophylline (5×10^{-3} M).

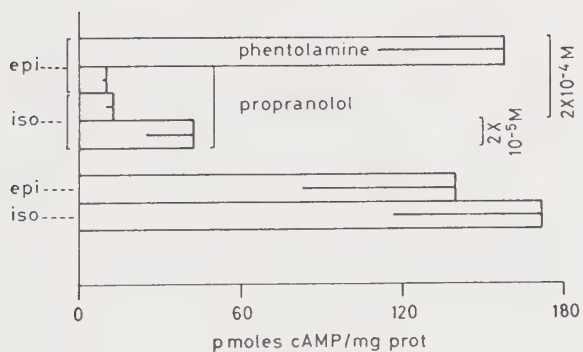
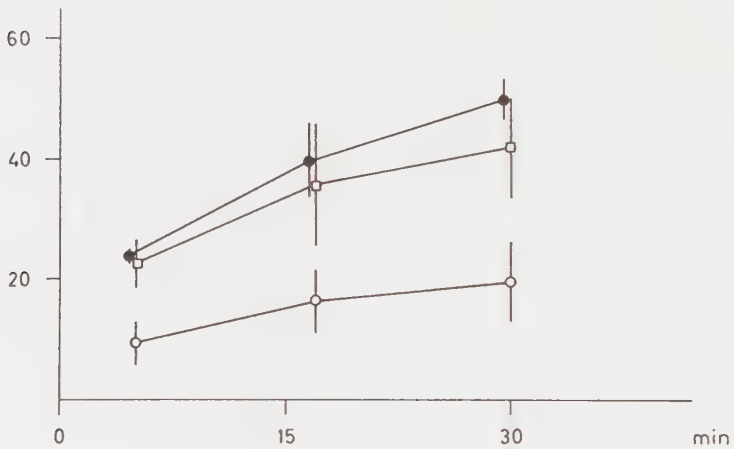


Figure 6.

Effets du betanechol (10^{-4} M) et du carbachol (10^{-4} M) sur la sécrétion d'amylase dans la parotide du lapin in vitro après 5, 17 et 30 minutes de stimulation.

Figure 1 à 9 : les résultats sont exprimés en % par rapport à l'amylase totale $\pm$ l'écart-type. La moyenne est établie sur la base minimale de 4 valeurs.

Amylase secreted
% of total



● = betanechol 10^{-4} M □ = carbachol 10^{-4} M ○ = control

Figure 7.

Effets de l'isoprotérénol (10^{-4} M) et de la pilocarpine (10^{-4} M) sur la sécrétion d'amylase dans la parotide du lapin in vitro après 5, 17 et 30 minutes de stimulation.

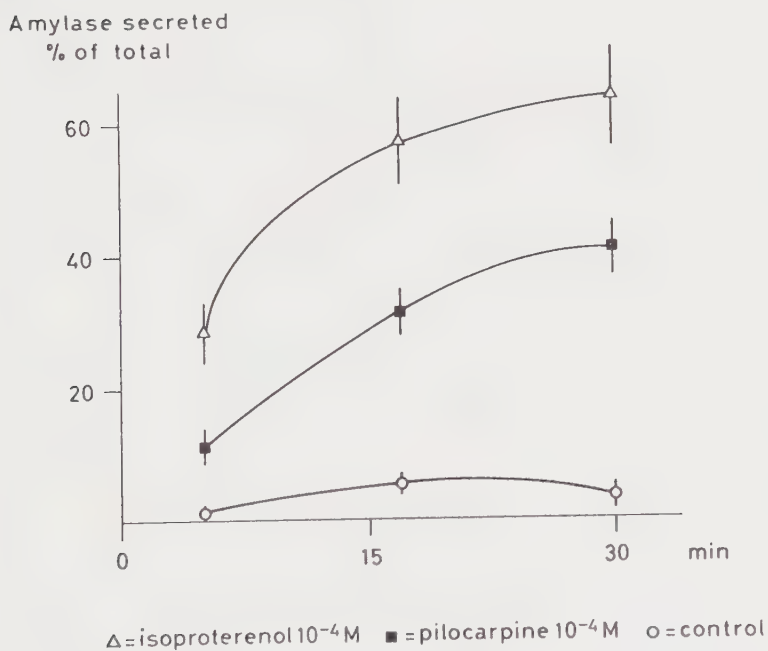
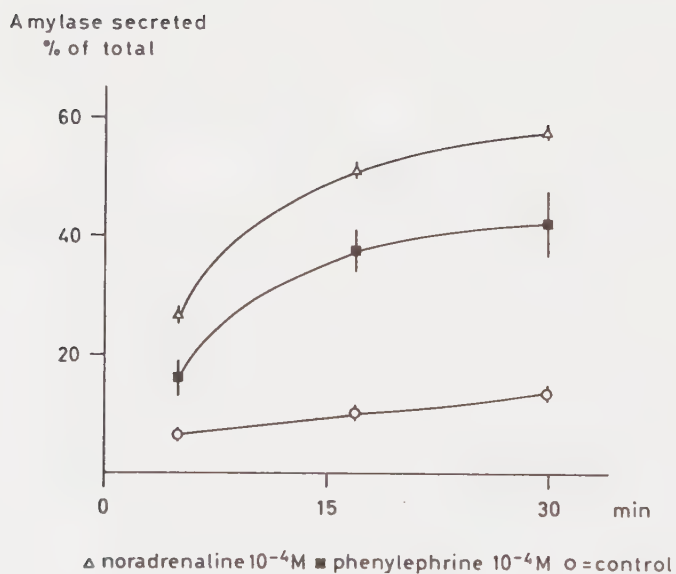


Figure 8.

Effets de la noradrénaline (10^{-4} M) et de la phényléphrine (10^{-4} M) sur la sécrétion d'amylase dans la parotide du lapin in vitro après 5, 17 et 30 minutes de stimulation.



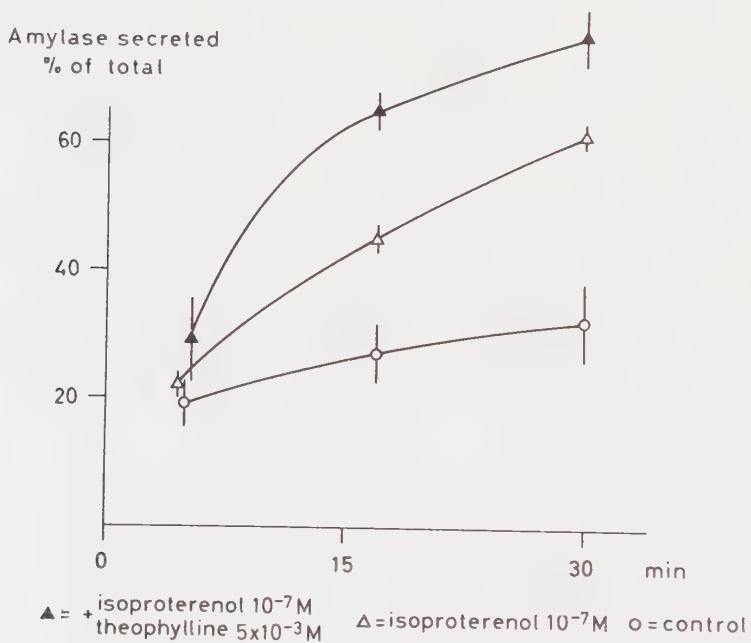
prouve bien que l'effet physiologique suit et ne précède pas l'augmentation intracellulaire du second messager, conformément au deuxième critère de Sutherland.

La potentiation de la sécrétion d'amylase, en d'autres termes la réponse au troisième critère, est montrée dans la figure 9. Pour ne pas masquer l'effet recherché, nous avons choisi une concentration d'isoprotérénol équivalente à 10^{-7} M (au lieu de 10^{-5} M). La théophylline (5×10^{-3} M) a été ajoutée en même temps que l'agent adrénérgique, et non pas dans le milieu de pré-incubation comme dans les conditions de détermination de l'AMP cyclique. La libération d'amylase, dans ces conditions, passe de 44.9 ± 1.65 % d'amylase totale sans théophylline à 65.2 ± 2.48 % en présence de théophylline après 17 minutes d'incubation, et après 30 minutes, respectivement de 60 ± 1.53 % à 71.6 ± 4.43 %.

Aucune sécrétion n'a pu être induite par l'apport d'AMP cyclique exogène ou de son dérivé dibutyrylique (2×10^{-3} M); le but de ces expériences était de satisfaire le quatrième critère de Sutherland.

Figure 9.

Effets de l'isoprotérénol (10^{-7} M), seul et en présence de théophylline (5×10^{-3} M), sur la sécrétion d'amylase dans la parotide du lapin in vitro après 5, 17 et 30 minutes de stimulation.



IV. Discussion.

L' α -amylase est l'une des protéines essentielles sécrétées par les glandes parotidiennes du rat ou du lapin, innervées à la fois par des fibres nerveuses cholinergiques et adrénergiques ²⁵. Cette enzyme est stockée dans les cellules acineuses glandulaires sous forme de granules zymogènes, prêts à être exportés dans le milieu extracellulaire. Nos résultats démontrent que le mécanisme hormonal de la sécrétion d' α -amylase, dans la parotide du lapin in vitro, est dépendant de l'AMP cyclique lors d'une stimulation induite par voie sympathique : nous avons, en effet, satisfait dans ce travail les trois premiers critères de Sutherland. Bien que Batzri et Selinger aient pu induire sur des tranches parotidiennes de rat une libération d'amylase avec le dérivé dibutyrylique de l'AMP cyclique, nous n'avons pu satisfaire, dans notre système, le quatrième critère en simulant l'effet physiologique par l'apport d'AMP cyclique exogène ou de son dérivé dibutyrylique ²⁶. Ces mêmes auteurs avec Schramm et Robinovitch obtiennent, du reste, dans un milieu dépourvu de théophylline après 5 minutes de stimulation par l'adrénaline (2×10^{-5} M), les concentrations d'AMP cyclique que nous obtenons dans un milieu contenant la théophylline ²⁷. Ces résultats, de même que notre impossibilité à satisfaire le quatrième critère de Sutherland, pourraient néanmoins s'expliquer par le fait que l'activité tissulaire des phosphodiesterases serait très variable d'une espèce animale à l'autre. De plus, bien qu'il soit reconnu que le dérivé dibutyrylique de l'AMP cyclique résiste mieux à l'hydrolyse par la phosphodiesterase, il n'a jamais été démontré de manière précise que sa diffusion à l'intérieur de la cellule fût favorisée par rapport à l'AMP cyclique non substitué. Des découvertes récentes, au contraire, ont même montré que celui-ci était mieux transporté que son dérivé dibutyrylique ²⁸.

Les catécholamines activent donc l'adénylate cyclase localisée dans la membrane des cellules acineuses parotidiennes. L'activation induite par l'isoprotérénol et par l'épinéphrine est bloquée totalement par le propranolol, l'antagoniste spécifique des récepteurs β -adrénergiques, alors que la phentolamine, l'antagoniste spécifique des récepteurs α -adrénergiques, est inactif. Ces résultats concordent ainsi avec l'hypothèse de Robison qui postule, en effet, l'identité partielle, voire totale, de l'adénylate cyclase avec le récepteur β -adrénergique. Nos observations n'excluent cependant pas la participation de cellules effectrices sympathiques α -adrénergiques. En effet, nous observons une augmentation intracellulaire d'AMP cyclique (42.38 ± 0.94 picomoles / mg de protéine) après stimulation par la dopamine (10^{-4} M) ; or, il a été montré dans d'autres systèmes que cette catécholamine stimulait de manière préférentielle les récepteurs α -adrénergiques plutôt que les récepteurs β -adrénergiques^{29,30}. Une augmentation est aussi détectable (résultats non publiés) après stimulation par la phényléphrine (10^{-4} M) qui induit une sécrétion d'amylase égale à 70 % de celle induite par l'isoprotérénol (10^{-4} M), le sécrétagogue le plus puissant de notre système.

La sécrétion d' α -amylase induite par les agents parasymphathiques ne dépend pas de l'AMP cyclique : aucune augmentation intracellulaire du nucléotide cyclique ne peut être déterminée après stimulation par la pilocarpine, le carbachol, ou le betanecol. Au vu de ces résultats, il semble intéressant de savoir pourquoi, pour le même effet physiologique, le second messager n'est impliqué que dans le cas d'une stimulation induite par voie sympathique et non pas aussi dans le cas d'une stimulation induite par voie parasymphathique. Rossignol et al., étudiant les mécanismes de la sécrétion des glycoprotéines dans les glandes sous-maxillaires de rat, ont soulevé l'hypothèse suivante: dans une sécrétion induite par voie sympathique l'AMP cyclique

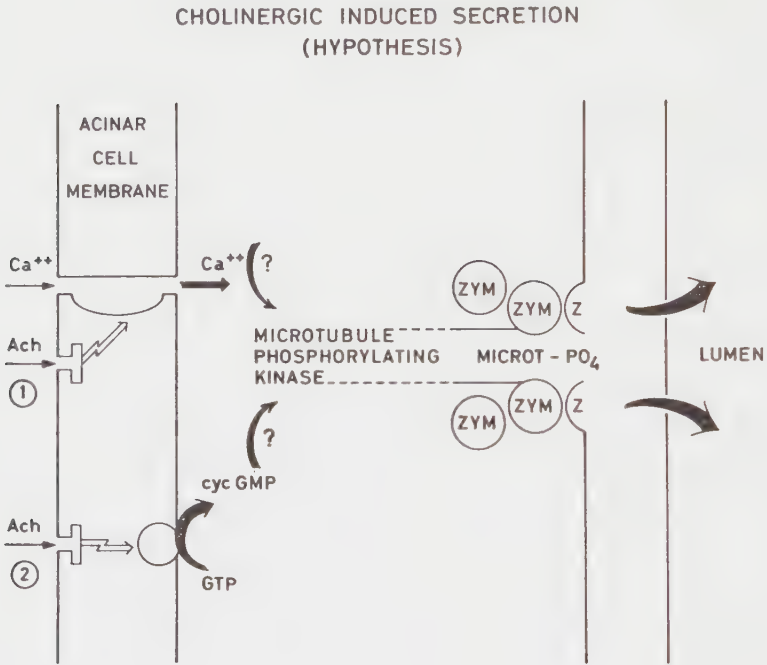
agirait sur une protéine kinase qui, à son tour, phosphorylerait les microtubules favorisant ainsi l'exportation des produits de sécrétion (les granules zymogènes d' α -amylase dans notre système) dans la lumière des acini glandulaires ; dans une sécrétion induite par voie parasympathique le second messenger pourrait être le GMP cyclique (guanosine 3'5 mono-phosphate cyclique) ou le Ca^{++} qui activeraient directement la protéine kinase ³¹. L'existence de protéines kinases parotidiennes a, du reste, également été démontrée ³². La figure 10 résume ces hypothèses.

T.P. Lee, J.F. Kuo et P. Greengard ont montré récemment le rôle du GMP cyclique dans le muscle cardiaque, certaines structures du système nerveux central et le muscle lisse intestinal ; ils localisent son action au niveau des sites muscariniques des terminaisons cholinergiques ³³. Nos essais préliminaires, effectués en présence d'agents parasympathiques, n'ont pu déterminer dans notre système une augmentation intracellulaire de GMP cyclique, mesuré par une méthode de marquage préalable au moyen de la guanosine tritiée. Il reste néanmoins à s'assurer de la fidélité de cette méthode avant de tirer des conclusions définitives. D'autre part, un nombre restreint d'expériences effectuées dans un milieu d'incubation dépourvu de Ca^{++} n'a pas permis, à ce jour, de mettre en évidence que la sécrétion induite par les agents parasympathiques dépendait de manière impérative de l'environnement calcique. On peut cependant supposer que, dans nos conditions expérimentales, le pool de Ca^{++} endogène était juste suffisant pour assurer, dans le cas d'une stimulation parasympathique, une sécrétion d'amylase strictement dépendante du Ca^{++} . Cette hypothèse pourrait être vérifiée si l'on ajoutait au milieu d'incubation des agents chélateurs spécifiques du Ca^{++} (EGTA).

Il ressort de ce travail que la parotide du lapin in vitro est un modèle adéquat pour l'étude du mécanisme hormonal contrôlant la sécrétion d' α -amylase et, partant, des processus sécrétoires dépendant de l'AMP cyclique ou du GMP cyclique.

Figure 10.

Hypothèse postulée pour la sécrétion cholinergique d'amylase dans la parotide du lapin in vitro.



REFERENCES

- 1) Rall T.W. and Sutherland E.W. (1962)
Adenyl cyclase. II. The enzymatically catalyzed formation of adenosine 3',5'- phosphate and inorganic pyrophosphate from adenosine triphosphate.
J. Biol. Chem. 237, 1228
- 2) Hirata M. and Hayaishi O. (1967)
Adenyl cyclase of *Brevibacterium liquefaciens*.
Biochim. Biophys. Acta 149, 1
- 3) Robison G.A., Butcher R.W. and Sutherland E.W. (1970)
On the relation of hormone receptors to adenyl cyclase.
In Fundamental concepts in drug-receptor interactions.
Academic Press Inc., New-York
- 4) Davoran P.R. and Sutherland E.W. (1963)
The cellular location of adenylcyclase in the pigeon erythrocyte.
J. Biol. Chem. 238, 3016
- 5) Oye I. and Sutherland E.W. (1966)
The effect of epinephrine and other agents on adenyl cyclase in the cell membrane of ovarian erythrocytes.
Biochim. Biophys. Acta 127, 347
- 6) Rodbell M. (1967)
Metabolism of isolated fat cells. V. Preparation of "ghosts" and their properties ; adenylcyclase and other enzymes.
J. Biol. Chem. 242, 5744

- 7) De Robertis E., De Lores Arnaiz G.R., Alberici M.,
Butcher R.W. and Sutherland E.W. (1967)
Subcellular distribution of adenylyl cyclase and cyclic
phosphodiesterase in rat brain cortex.
J. Biol. Chem. 242, 3487
- 8) Weiss B. and Costa E. (1968)
Regional and subcellular distribution of adenylyl cyclase
and 3'5' cyclic nucleotide phosphodiesterase in brain
and pineal gland.
Pharmacology 17, 2107
- 9) Schorderet M., McAfee D.A. and Greengard P. (1972)
Muscarinic and α -adrenergic blockade of cyclic AMP
increase in stimulated ganglia.
Experientia 28, 743
- 10) McAfee D.A., Schorderet M. and Greengard P. (1971)
Adenosine-3',5'-monophosphate in nervous tissue : Increase
associated with synaptic transmission.
Science 171, 1156
- 11) McAfee D.A. and Greengard P. (1972)
Adenosine 3'5' monophosphate : Electrophysiological
evidence for a role in synaptic transmission.
Science 178, 310
- 12) Bdolah A. and Schramm M. (1965)
The function of 3'5' cyclic AMP in enzyme secretion.
Biochem. Biophys., Res. Comm. 18, 452

- 13) Batzri S., Selinger Z. and Schramm M. (1971)
Potassium ion release and enzyme secretion : adrenergic regulation by α and β -receptors.
Science 174, 1029
- 14) Hand A.R. (1972)
Adrenergic and cholinergic nerve terminals in the rat parotid gland. Electron microscopic observations on permanganate-fixed glands.
Anatomical record 173, 131-140
- 15) Freitag P. and Engel M.B. (1970)
Autonomic innervation in rabbit salivary glands.
Anatomical record 167, 87-106
- 16) Badab H., Ben-Zvi R., Bdolah A. and Schramm M. (1967)
Effects of inducers, substrates and inhibitors on amylase secretion by rat parotid slices.
Eur. J. of Biochem. 1, 96-101
- 17) Lees M.B. and Paxman S. (1972)
Modification of the Lowry procedure for the analysis of proteolipid protein.
Analytical Biochem. 47, 184
- 18) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951)
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265

- 19) Krishna G., Weiss B. and Brodie B.B. (1968)
A simple, sensitive method for the assay of adenylyl cyclase.
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 163, 379
- 20) Brown B.L., Albano J.D.M., Ekins R.P. and Sgherzi A.M. (1971)
A simple and sensitive saturation assay method for the
measurement of adenosine 3'5' cyclic monophosphate.
Biochem. J. 121, 561
- 21) Monnard P. and Schorderet M. (1973)
Cyclic adenosine 3'5' monophosphate concentration in
rabbit parotid slices following stimulation by secretagogues.
Eur. J. Pharm., In Press
- 22) Ueha T., Catanzano O., Hanson R. and Lindsay R.H. (1971)
Metabolic alterations accompanying α -amylase secretion
by rat parotid tissue in vitro.
Am. J. Physiol. 220, 312
- 23) Rapp G.W. (1961)
Synthesis and secretion of amylase by rat parotid gland
slices
J. Dent. Res. 40, 1225
- 24) Grand R.J. and Gross P.R. (1969)
Independent stimulation of secretion and protein synthesis
in rat parotid gland.
J. Biol. Chem. 244, 5608
- 25) Burgen A.S.V. and Emmelin N.G. (1961)
In Physiology of the salivary glands.
Edward Arnold Ltd

- 26) Batzri S. and Selinger Z. (1973)
Enzyme secretion mediated by the epinephrine β -receptor
in rat parotid slices.
J. Biol. Chem. 248, 356-360
- 27) Batzri S., Selinger Z., Schramm M. and Robinovitch M.R.
(1973)
Potassium release by the epinephrine α -receptor in rat
parotid slices.
J. Biol. Chem. 248, 361-368
- 28) Ryan W.L. and Durich M.A. (1971)
Adenosine -3',5'- monophosphate and N⁶-2'-O- dibutyryl-
adenosine -3',5'- monophosphate transport in cells.
Science 177, 1002
- 29) Kebabian J.W. and Greengard P. (1971)
Dopamine-sensitive adenylyl cyclase : possible role in
synaptic transmission.
Science 174, 1346
- 30) Brown J.H. and Makman M.H. (1972)
Stimulation by dopamine of adenylate cyclase in retinal
homogenates and of adenosine -3',5'- cyclic monophosphate
in intact retina.
Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 69, 539
- 31) Rossignol B., Herman G. and Keryer G. (1972)
Inhibition by colchicine of carbamylcholine induced glyco-
protein secretion by the submaxillary gland. A possible
mecanism of cholinergic induced protein secretion.
FEBS Letters 21, 189

- 32) Wilchek M., Salomon Y., Lowe M. and Selinger Z. (1971)
Conversion of protein kinase to a cyclic AMP independent
form by affinity chromatography on N⁶- caproyl 3',5'-
cyclic adenosine monophosphate sepharose.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 45, 1177
- 33) Lee T.P., Kuo J.F. and Greengard P. (1972)
Role of muscarinic cholinergic receptors in regulation of
guanosine 3'5' cyclic monophosphate content in mammalian
brain, heart muscle and intestinal smooth muscle.
Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 69, 11, 3287-3291

